

ПРИЛОЖЕНИЕ 9.

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
БОТАНИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ ИМ. В.Л. КОМАРОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**



УТВЕРЖДАЮ
Директор БИН РАН,

Д.В. Гельтман
"29" августа 2017 г.

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПО ВЫДЕЛЕНИЮ ЧИСТЫХ
КУЛЬТУР БАЗИДИОМИЦЕТОВ ИЗ ПРИРОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ**

(Разработано Н.В. Псурцевой)

Санкт-Петербург 2017

9. Выделение чистых культур базидиомицетов из природных экосистем состоит из ряда последовательных процедур и учитывает требования следующих стандартных операционных процедур:

- Стандартная операционная процедура по приготовлению питательных сред и стерильной посуды (Приложение 2);
- Стандартная операционная процедура по пересеву культур базидиомицетов коллекции БИН РАН (Приложение 4);
- Стандартная операционная процедура по контролю жизнеспособности культур базидиомицетов коллекции БИН РАН (Приложение 5);
- Стандартная операционная процедура по контролю чистоты (аутентичности) культур базидиомицетов коллекции БИН РАН (Приложение 6);
- Стандартная операционная процедура по получению морфологических характеристик культур базидиомицетов коллекции БИН РАН (Приложение 11);
- Стандартная операционная процедура по получению физиологических характеристик культур базидиомицетов коллекции БИН РАН (Приложение 12);
- Стандартная операционная процедура по биохимической характеристике культур базидиомицетов коллекции БИН РАН (Приложение 13);
- Стандартная операционная процедура по получению генеративной стадии культур базидиомицетов коллекции БИН РАН (Приложение 14);
- Стандартная операционная процедура по верификации/ характеристике культур базидиомицетов методом секвенирования последовательностей ITS1-5S-ITS2 участка nrDNA (Приложение 15);
- Стандартная операционная процедура по ведению документации Коллекции культур базидиомицетов БИН РАН (Приложение 16);
- Стандартная операционная процедура по подготовке и закладке на хранение ваучерных гербарных образцов (Приложение 17).

Процесс выделения чистых культур базидиомицетов из природных базидиом можно разделить на 3 этапа: сбор материала; выделение в культуру; очистка и верификация культур.

9.1. Сбор материала.

9.1.1. Каждый образец собирают и транспортируют отдельно. Для этого применяют маленькие чистые контейнеры, вощеную бумагу (wax-paper) или алюминиевую фольгу. Следует собирать образец, состоящий из нескольких базидиом молодых и зрелых, в хорошем физиологически-активном состоянии.

9.1.2. Описывают природный субстрат, с которого собран образец, или дерево, под которым он рос (в случае базидиом эктомикоризных видов), а также цвет, запах, поверхность и другие признаки, которые могут измениться или исчезнуть со временем, придерживаясь классических методов сбора микологических образцов.

9.1.3. Цифровая цветная фотография образца делается в природном местообитании в разных ракурсах, с обязательной демонстрацией геминофора и других важных признаков.

9.1.4. Фиксируется географическое положение местообитания образца, включая координаты GPS.

9.1.5. Наилучшие результаты достигаются в хорошую погоду с умеренной влажностью воздуха. При сборе в дождливую погоду увеличивается процент бактериального и дрожжевого заражения культур.

9.1.6. Чем свежее материал, из которого производится выделение, тем больше шансов на успех.

9.1.7. При необходимости собранный материал можно хранить до 2-3 дней при 4-6 °С.

9.1.8. Споровые отпечатки, полученные на стерильной фольге, пригодны для выделения в течение 1-4 месяцев при хранении их при 4-6 °С.

9.1.9. Важным правилом является гербаризация и сохранение базидиомы, из которой выделялась культура, в качестве ваучерного образца для возможности профессиональной идентификации образца или реидентификации в дальнейшем (Приложение 17).

9.2. Выделение в культуру.

9.2.1. Необходимые материалы и инструменты для выделения культур: чашки Петри диаметром 40 мм со средой (сусло-агар) с добавлением антибиотика (0,05-0,07% раствора канамицина) (Приложение 2); спиртовка; набор скальпелей разной формы и размера; маникюрные ножницы из прочной стали, флакон со спиртом для заправки спиртовки, стерилизации и охлаждения инструмента, обработки рук и рабочей поверхности стола; аптечный флакон или тюбик вазелина; бумажные салфетки; водостойкие маркеры; Parafilm/изолента для герметизации чашек; контейнеры для хранения и транспортировки чашек; пластиковые криофлаконы на 1,8-2 мл, заполненные с помощью стерильных шприцев или Пастеровских пипеток скошенным сусло-агаром для отсева полученных культур для транспортировки и временного хранения.

9.2.2. Место выделения: Выделение в чистую культуру предпочтительно проводить в лабораторных условиях, в специально предназначенном для этого боксе или ламинарном шкафу. В полевых условиях также можно организовать рабочее место по выделению культур, например, в гостинице, на стационарах/кордонах в заповедниках, а в безветренную погоду даже на открытом воздухе.

9.2.3. Выделение культур из плодовых тел.

Этот способ выбирают, при выделении дикариотических культур из крупных мясистых плодовых тел, например, афиллофороидных грибов, свежих или сухих; эктомикоризных грибов, споры которых не прорастают при обычных условиях выделения; и тех групп сапротрофов, для которых также известны проблемы с прорастанием спор в искусственных условиях, например гастероидных грибов.

9.2.3.1. Поверхность плодового тела очищают от грязи, можно слегка обжечь базидиому над пламенем или обработать спиртом.

9.2.3.2. Вблизи факела спиртовки плодовое тело разрезают или разламывают, прожигают скальпель и из середины вырезают чистые кусочки, 5-10 мм³ так, чтобы они не соприкасались с поверхностными участками. На чашку помещают несколько (3-5) таких кусочков из разных частей плодового тела. У грибов с крупными плодовыми телами, мясистой шляпкой и ножкой изоляты можно брать из разных мест: шляпки, ножки, места перехода шляпки в ножку, гименофора. Если кутикула (кожица поверхности шляпки) легко отделяется от шляпки, бывает полезно снять кутикулу и проводить выделение с очищенной таким образом поверхности шляпки. Если молодая базидиома еще закрыта покрывалом, то выделение удобно проводить из гименофора или вырезать изоляты в основании гименофора на границе с тканью шляпки.

9.2.4. Выделение культур из базидиоспор. Способ выделения культур из базидиоспор выбирают, когда необходимо получить монокарионы или виды для получения дикарионов имеют слишком мелкие, тонкие или резупинантные плодовые тела.

9.2.4.1. Выделение их базидиоспор на чашку со средой. Кусочек плодового тела с гименофором или отдельную пластинку прикрепляют медицинским вазелином на внутреннюю сторону крышки от чашки Петри гименофором вниз так, чтобы гименофор находился «в подвешенном» состоянии и не касался поверхности среды.

9.2.4.2. Крышку закрывают, заклеивают парафином/или изолентой и оставляют при комнатной температуре. Время инкубации чашек – от 30 мин до 24 час, в зависимости от вида и биологического состояния объекта выделения.

9.2.4.3. После того, как на поверхности агаризованной среды станут заметны насыпавшиеся споры, прикрепленный вазелином кусочек базидиомы аккуратно удаляют при помощи пинцета, а чашку оставляют для прорастания спор.

9.2.4.4. После начала прорастания несколько участков со спорами помещают на новую чашку или в криофлакон со скошенной агаризованной средой.

9.2.4.5. Сбор базидиоспор на стерильный кусочек алюминиевой фольги, с последующим посевом в лабораторных условиях. Посев осуществляют следующим способом: готовят пробирки с 5 мл стерильной воды, вносят туда скальпелем небольшой соскоб спор и встряхивают до образования суспензии спор. Полученную суспензию выливают на чашку Петри диаметром 60-90 мм, закрывают чашку и оставляют ее при комнатной температуре на 30-40 мин. для осаждения спор. Затем чашку открывают, быстрым резким движением сливают воду, чашку снова закрывают и оставляют для прорастания при комнатной температуре.

9.2.4.6. Начало прорастания контролируют под стереомикроскопом. После начала прорастания действуют согласно п. 9.2.4.4.

9.3. Очистка и верификация культур. Результат выделения в культуру, к сожалению, бывает не всегда положителен. Существует 4 возможности: 1) отсутствие роста, 2) сплошное бактериальное или микромицетное заражение, 3) рост базидиомицета есть, но культура смешанная, 4) успешное выделение.

9.3.1. Отсутствие роста может быть связано с тем, что базидиома находилась в неактивном физиологическом состоянии. Но чаще это связано с трудностями выделения в культуру некоторых видов базидиомицетов, даже из группы сапротрофов.

9.3.2. Сплошное заражение легко может быть выявлено уже через несколько дней, когда на среде появляются бактериальные и дрожжевые колонии, а затем и несовершенные грибы. Микромицеты можно выявить по быстрой скорости роста и характерным структурам бесполого размножения.

9.3.3. Если культура смешанная и на чашке можно отделить базидиальный мицелий от контаминанта, то с таким заражением можно справиться путем серии пересевов на новые чашки.

9.3.4. Если выделенная культура визуально не вызывает сомнения, ее пересевают на новую чашку и заматывают кусочком парафила для предотвращения высыхания, или в криофлакон со скошенной агаризованной средой для транспортировки и временного хранения.

9.3.5. Прежде чем вводить выделенную культуру в коллекционный фонд, она должна пройти первичную верификацию. Основой для верификации культур базидиомицетов служит культуральная характеристика на основании нижеперечисленных признаков и соответствующих СОПов (Приложения 11, 12, 13, 14, 15).

9.3.6. Ростовые признаки – линейная скорость роста (мм/сут.; радиус или диаметр колонии в мм на определенный день; число суток/недель, необходимых для зарастания 60 мм

чашки Петри при посеве инокулюма с краю чашки) в соответствии с СОП «Стандартная операционная процедура по получению физиологических характеристик культур базидиомицетов коллекции БИН РАН» (Приложение 12).

9.3.7. Морфологическая характеристика колоний выполняется в соответствии с СОП «Стандартная операционная процедура по получению морфологических характеристик культур базидиомицетов коллекции БИН РАН» (Приложение 11).

9.3.8. Ферментативная активность. Как правило, используются экспресс методы для определения некоторых ферментов, например, окислительных и целлюлозолитических ферментов в соответствии с СОП «Стандартная операционная процедура по биохимической характеристике культур базидиомицетов коллекции БИН РАН» (Приложение 13).

9.3.9. Образование генеративной стадии в культуре. Получение в культуре примордиев или полноценно развитых плодовых тел, которые можно идентифицировать, служит хорошим подтверждением видовой принадлежности культуры. Генеративную стадию можно получать на стандартной агаризованной среде в чашке Петри или на специально приготовленных субстратах, содержащих, обычно, древесную составляющую с питательными добавками. В Коллекции LE-BIN для этих целей используются опилки лиственных пород деревьев с добавлением отрубей в соответствии с СОП «Стандартная операционная процедура по получению генеративной стадии культур базидиомицетов коллекции БИН РАН» (Приложение 14).

9.3.10. Молекулярно-генетические методы (метод скрещивания и ПЦР анализа). Метод скрещивания применим, если получен набор монокарионов и есть тестерные штаммы, с которыми можно скрестить проверяемую культуру. Для успеха в ПЦР анализе необходим ваучерный образец и/или наличие нужных данных в генетическом банке. Последовательность операций приведена в СОП «Стандартная операционная процедура по верификации/ характеристике культур базидиомицетов методом секвенирования последовательностей ITS1-5S-ITS2 участка nrDNA» (Приложение 15).

9.4. После проведения верификации культуры пересеваются на пробирки, им присваивают коллекционный номер и вводят в коллекционный фонд согласно соответствующим СОПам (Приложения 4, 1).

9.5. Информация из полевого журнала заносится в журнал коллекции и базу данных коллекции в соответствии с СОП «Стандартная операционная процедура по ведению документации Коллекции культур базидиомицетов БИН РАН». (Приложение 16).

9.6. Ваучерные гербарные образцы инсертируют в микологический гербарий LE в соответствии с СОП «Стандартная операционная процедура по подготовке и закладке на хранение ваучерных гербарных образцов» (Приложение 17).

Выделение новых культур осуществляется с использованием следующего лабораторного оборудования: ламинарные шкафы ВЛ-12, паровой стерилизатор (автоклав) ГК-100, термостаты ТС-1/80 и хладотермостаты ТСО-1/80, низкотемпературный холодильник (New Brunswick Scientific U-410, микроскопическая техника (световой микроскоп AxioScope A1, Carl Zeiss, стереомикроскопы МБС-10 и МС-2), холодильники, центрифуги, вытяжные шкафы, электрические сушилки и т.д.; оргтехники (РС с ОС Windows, принтеры, сканеры и пр.), фототехники (цифровые фотокамеры Canon, Olympus и пр.) и расходных материалов: комплекты инструментов для работы в ламинаре, наборы

микропипеток, криофлаконы, стерильные пластиковые чашки Петри, реактивы для приготовления сред, спирт и т.д.

Зав. лабораторией биохимии грибов БИН РАН,
Куратор Коллекции LE-BIN



Н.В. Псурцева